

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11127898 A**

(43) Date of publication of application: **18 . 05 . 99**

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

**//(C12Q 1/68 , C12R 1:01), (C12N
15/09 , C12R 1:01)**

(21) Application number: **09297084**

(22) Date of filing: **29 . 10 . 97**

(71) Applicant: **YAKULT BIO SCIENCE KENKYU
ZAIDAN RIKAGAKU
KENKYUSHO**

(72) Inventor: **BENNO YOSHIMI
KAGEYAMA AKIKO**

(54) **PRIMER FOR AEROFACIENS BACTERIUM**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new primer comprising a primer or a probe for Eubacterium aerofaciens having a specific base sequence or a sequence complementary to the specific base sequence and useful for identification and detection or the like of species of bacterium which is predominant in intestine.

SOLUTION: This new primer or probe for Eubacterium aerofaciens has a sequence represented by formula I or II or a sequence complementary to the base sequence and is capable of rapidly, simply and precisely identifying Eubacterium aerofaciens at a low cost and used also for analysis or the like of intestinal flora and grasps conditions of digestive tract or the like from the result and enables prevention, treatment or the like of various diseases. The primer is obtained by comparing a base sequence of plural bacterial strains of Eubacterium aerociens with a base sequence of 16Sr RNA gene of Eubacterium lentum which is the closest related species and designing the structure and artificially synthesizing these sequences by DNA synthesizer according to the base sequence.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

CTTTCAGCAG GGAAGAGTCA A I

AGCCATGCAC CACCTGTATG G II

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-127898

(43)公開日 平成11年(1999)5月18日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// (C 1 2 Q 1/68			
C 1 2 R 1:01)			
(C 1 2 N 15/09	Z N A		

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-297084

(22)出願日 平成9年(1997)10月29日

(71)出願人 597099885
財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究
財団
東京都港区東新橋1丁目1番19号

(71)出願人 000006792
理化学研究所
埼玉県和光市広沢2番1号

(72)発明者 辨野 義己
埼玉県和光市広沢2-1 理化学研究所内

(72)発明者 影山 亜紀子
埼玉県和光市広沢2-1 理化学研究所内

(74)代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54)【発明の名称】 アエロファシエンス菌用プライマー

(57)【要約】

【解決手段】 配列番号1又は2塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有するユーバクテリウム・アエロファシエンス用プライマー又はプローブ、及びこのプライマーを使用するユーバクテリウム・アエロファシエンスの同定・検出法。

【効果】 迅速且つ簡便にユーバクテリウム・アエロファシエンスの同定・検出を行なうことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1又は2の塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有するユーバクテリウム・アエロファシエンス用プライマー又はプローブ。

【請求項2】 請求項1記載のプライマーを使用することを特徴とするユーバクテリウム・アエロファシエンスの同定方法。

【請求項3】 請求項1記載のプライマーを使用することを特徴とするユーバクテリウム・アエロファシエンスの検出方法。

【請求項4】 (1) 検体中のDNAを抽出する工程、(2) 請求項1記載のプライマーを用いてPCR反応を行なう工程及び(3) 工程(2)により増幅されたDNA断片を検出する工程を含むユーバクテリウム・アエロファシエンスの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトや動物腸内の優勢菌であるユーバクテリウム・アエロファシエンス(*Eubacterium aerofaciens*)菌種の同定に有用なDNAプライマー及びプローブ並びにこれを用いるアエロファシエンス菌種の同定・検出方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】ヒトや動物の腸管内には様々な細菌群が常在し複雑な腸内菌叢を形成している。これらは宿主が健康でありさえすれば、安定した状態であることが知られている。その腸内菌叢を形成する最優勢菌群の1つとしてユーバクテリウム属が挙げられる。従ってユーバクテリウム属細菌は土壌や泥から分離されることも多いが、主にヒトや動物の腸管や臨床材料から分離される。

【0003】このユーバクテリウム属細菌のうち、腸内で最も優勢であるアエロファシエンスは、腸内のユーバクテリウム属細菌のうち約80%を占め、ヒトの腸内菌叢の約10%を占めている。またアエロファシエンスは、食餌成分の違いにより腸内の菌数の割合が変化することが知られている。例えば、農村部の日本人の腸内からはアエロファシエンスは25.1%と高率に分離されたが、都市部の北米人では5.2%と低いことが報告されている。また、食物繊維(玄米食)をヒトに給与するとアエロファシエンスの構成比が著しく減少するとも報告されており、生活環境や個体の差によりアエロファシエンスの菌数や出現頻度に違いが生まれることが示唆される。更に、ユーバクテリウム属細菌の動向は腸内の有用細菌であるビフィドバクテリウム属細菌と類似していることもわかっている。

【0004】これらのことから、ヒトや動物の腸管内におけるアエロファシエンスの動向は、生体の健康状態に密接に関わっているものと考えられている。このため、ユーバクテリウム属細菌に関するさらなる研究を行ない、生理作用等の知見を蓄積することが要望されてい

る。このため、糞便等からアエロファシエンスを迅速且つ正確に検出し、その動向から個体の健康状態を把握することが重要である。

【0005】しかしながら、現状においてアエロファシエンスはグラム陽性、無芽胞の桿菌の内プロピオニバクテリウム(*Propionibacterium*)属細菌、ビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)属細菌及びラクトバチルス(*Lactobacillus*)属細菌等以外の細菌として分類されているのみであり、生理活性等未知の部分の多い細菌である。従って、その検出同定は、コロニー形状や顕微鏡観察、糖分解性状を検査することにより行なわれており、このような表現形質を元にした同定方法は、操作が煩雑であり、試験者の熟練を要するものであった。

【0006】また、近年では、DNA-DNAホモロジーによる判定も行なわれるようになっている(TAKAYUKI EZAKI, YASUHIRO HASHIMOTO, AND EIKO YABUCHI. IJS B, 1989, vol. 39, p224-229)。しかしながら、この同定法も長時間を必要とし、迅速な菌種同定を行なうには好ましいものではなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】このように、発酵性状の違いやDNA-DNAホモロジーからアエロファシエンスの同定・解析を行なうには、長時間を要し、また操作が煩雑である等の問題があった。従って、本発明の目的は、糞便や腸内細菌叢中のアエロファシエンスを迅速、簡便に同定・検出する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】斯かる現状に鑑み本発明は鋭意研究を行なったところ、アエロファシエンスに特異的な塩基配列を有するDNAプライマーを見出し、これを用いれば、細菌の糖分解性状の確認など煩雑な操作を行なうことなく、検体から抽出した細菌由来のDNAのPCR反応により、迅速かつ簡便にアエロファシエンスの同定・検出が可能となることを見出し本発明を完成した。

【0009】すなわち本発明は、配列番号1又は2の塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有するユーバクテリウム・アエロファシエンス用プライマー又はプローブを提供するものである。

【0010】また、本発明は、上記のユーバクテリウム・アエロファシエンス用プライマーを使用することを特徴とするユーバクテリウム・アエロファシエンスの同定又は検出方法を提供するものである。

【0011】更に本発明は、(1) 検体中のDNAを抽出する工程、(2) 上記のユーバクテリウム・アエロファシエンス用プライマーを用いてPCR反応を行なう工程及び(3) 工程(2)により増幅されたDNA断片を検出する工程を含むユーバクテリウム・アエロファシエンスの検出方法を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】ユーバクテリウム属細菌とは嫌気性、非鞭毛、非運動性、無芽胞、非分岐状、グラム陽性で、菌の配列が対になっているか短鎖状を呈する桿菌として命名、提唱された菌属である。また、代謝産物により他のグラム陽性桿菌であるプロピオニバクテリウム属細菌、ピフィドバクテリウム属細菌、ラクトバチルス属細菌などと区別されている。この内、糖分解性状として、ブドウ糖、マンノース、ガラクトース、フルクトース、マルトース及びラクトースより酸を産生し、アラビノース、キシロース、メレチトース、可溶性デンプン、グリコーゲン、マンニット、ソルビット、イノシット及びエリスリットより酸を産生しない菌群がユーバクテリウム・アエロファシエンスである。

【0013】上記のような分類において、アエロファシエンスのプライマーを作成するにあたり、まず遺伝学的な分類を明確化させることとした。すなわち、系統分類の指標として信頼性の高い16S rRNA遺伝子をターゲットに用い、分類を行なった。ここで本発明者が比較対象として新たに16S rRNA遺伝子のシーケンシングを行なったアエロファシエンス菌株は、具体的には、基準株であるユーバクテリウム・アエロファシエンス (*Eubacterium aerofaciens*) JCM6479株及び参考株であるJCM7790株、JCM7791株である。これらの配列は、遺伝研データベースDDBJに登録する予定である。

【0014】本発明者がシーケンスを行なって得た塩基配列とデータベース (DDBJ, Genbank 等) より得た配列とを比較・検討し、NJ法 (Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425) を用いて分類を行なった。その結果、アエロファシエンスはユーバクテリウム属ではなくコリオバクテリウム属 (*Coriobacterium*) に属するのが妥当であると考えられた。しかしながら、本明細書においては便宜上ユーバクテリウム属に属するものとして記載する。

【0015】一方で、アエロファシエンス特異的プライマーの作成は以下のようにして行った。まず、ターゲットには16S rRNA遺伝子を用い、同定・解析には、PCR法等の手段が必要となるため、RNAでなくDNAを用いた。

【0016】上記3株及び最も近縁の種であるユーバクテリウム・レントム (*Eubacterium lentum*) の遺伝子配列を比較することによりプライマーを設計した。その際、塩基数20程度、GC含量が約50%となる部分を探索した。その結果、フォワード及びリバースのプライマーとして各3種類ずつが設計された (表1)。そこで、AERO-FとAERO-Rを用いて特異性を検討したところ、アエロファシエンスだけでなく、レントム

についても増幅する結果が得られた。このため、AERO-F1とAERO-R1、AERO-F2とAERO-R2についても検討したところAERO-F1とAERO-R1との組み合わせにおいて良好な結果が得られた。

【0017】こうして得られたAERO-F1及びAERO-R1のオリゴヌクレオチドの長さは21bpで、それぞれ配列番号1及び2に示した。これらはPCR反応等の操作上最も好適な長さであるが、使用に際しては、各々の16S rRNA遺伝子中において、該オリゴヌクレオチドに隣接する数〜十数bpの塩基配列が付加させたものを用いても良い。このとき、塩基配列の増減したプライマーが、他種の細菌を増幅する場合もあるので、そそれについては、使用しないか、PCR条件の改変等を行なう必要がある。

【0018】またこのとき、PCR反応の条件についても検討を行った。すなわち、アニーリング温度を58、60、63℃と変化させ、サイクル数も25及び30サイクルの2種類で検討した。その結果、63℃、25サイクルが最も好適な条件であった。

【0019】上記のプライマーは、その塩基配列に従い、DNA合成機により、人工的に合成される。その種特異性は、ユーバクテリウム属細菌の基準株及び参考株9種11株及びアエロファシエンスの分離株3株のDNAに、プライマーを反応させた場合の増幅の有無を指標として確認した。結果として、プライマーのアエロファシエンスに対する特異性に問題はなかった。また、他の属の細菌4株についても検討したところ、やはり増幅は見られなかった。更に、グラム陽性桿菌の新鮮分離株約300株から、糖発酵試験によってユーバクテリウム・アエロファシエンスと同定された株178株と本発明のプライマーとを反応させたところ、全ての株とバンドを形成した。なお、糖発酵試験でアエロファシエンスと同定されなかった株と本発明のプライマーとは反応しなかった。

【0020】本発明のプライマーは、ユーバクテリウム・アエロファシエンス (*Eubacterium aerofaciens*) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、アエロファシエンスの同定、解析を行なうためのプライマーやプローブとして使用することができる。プライマーとしては、公知のユニバーサルプライマー等と組み合わせて用いることも可能であるが、その組み合わせによっては種特異的な検出を行なえないものもあるので、配列番号1又は2記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと組み合わせることが好ましい。

【0021】なお、今回新たにシーケンスを行なったことにより、配列番号1及び2に示す配列以外にも種特異的な配列が見出されている。しかしながら、これらの配列や他の公知のプライマーで同定を行なっても、別の種に属する株と反応したり、目的とする種の株と反応し

10

20

30

40

50

ない場合も多く、使用上好ましいものではなかった。このようなプライマーを用いてもPCR反応時の条件設定によって種特異的な反応性は達成されるものと考えられるが、現状ではそのような条件は見出されていない。

【0022】本発明のプライマーは、このように種特異性を有するため、これらを用いて糞便や組織切片中のアエロファシエンスを迅速に同定できる。また、アエロファシエンスをEG (Eggerth-Gagnon) 培地 (栄研社製) 等に培養し、形成されたコロニーから直接、あるいは培養した菌体からDNAを抽出し、プライマーとの反応性を調べることによって菌種の簡易同定を行なうことができる。

【0023】また、本発明のプライマーを用いれば、アエロファシエンスのDNAから直接同定を行なうことも可能である。例えば、糞便等を遠心分離して得られるペレットから塩化ベンジル法等によってDNAを抽出し、これを鋳型DNAとし、本発明のプライマーで増幅反応を行なうことにより、アエロファシエンス特異的なDNA配列 (PCR産物) を得ることができる。このようにして得られたDNAを電気泳動すれば、バンドの有無からアエロファシエンスを同定することができる。

【0024】DNAを抽出する方法としては、定法であるMarmur法、その変法である酵素法、及び簡便法である塩化ベンジル法が好ましい。これらの方法は多少煩雑になるものの、酵素法において、幅広い菌種から収率よくDNAを抽出できる。また、純粋培養した細菌等から抽出したDNAに対しては、前述の方法の他、フェノール法等も好適に使用しうる。

【0025】通常、PCR法等にプライマーを使用する際には、2種類のプライマーを1組として用いる必要がある。例えば、配列番号1及び2に係るプライマーを用いれば、他種類存在する細菌群のうち、ユーバクテリウム・アエロファシエンスのDNAにおいてのみ、両者のプライマー間で増幅反応が起こり、これを同定することができる。また、上記プライマーと公知のユニバーサルプライマーとを組み合わせ用いてもよいが、その場合には、両者がリーディング鎖とラギング鎖との組み合わせになるようにする必要がある。また、PCRを行なう際に、鋳型のDNA量を段階希釈し、同様の解析を行えば、アエロファシエンスの定量化も可能である。また、本発明のプライマーは、アエロファシエンス特異的な配列を有しているため、単独でもプローブとして使用でき*

*る。

【0026】また、本発明のプライマーを用いれば、ヒト、動物等の腸内細菌叢等の解析も行なえる。現状では、アエロファシエンス以外の菌を検出することは不可能であるものの、アエロファシエンスの分布、菌数がわかれば、ビフィドバクテリウム属細菌等の菌数も予測されるため、個体健康状態等様々な情報が得られる。更に、その他の多岐にわたる細菌のプライマー、例えば本出願人が先に出願 (特願平9-219567号) しているビフィドバクテリウム属細菌用プライマー等と組み合わせ用いれば、細菌叢の全体像を把握することも可能である。

【0027】

【発明の効果】本発明のプライマーを使用すれば、迅速、簡便、低コスト且つ高精度にユーバクテリウム・アエロファシエンスの同定を行なうことができる。また、他の菌種特異的なプライマー等と組み合わせ使用することで、腸内細菌叢の解析等をも行なうことができる。更に、解析の結果から消化管等の状態が把握できるため、種々疾病等の予防・治療が容易になる。

【0028】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが本発明はこれらに限定されるものではない。

【0029】実施例1 プライマーの設計及び合成：系統学的に近隣の位置にあるユーバクテリウム・レンタムの16S rRNA遺伝子配列と、本発明者らが解読した上記の16S rRNA遺伝子配列を元に、アエロファシエンス特異的なプライマーの設計を行なった。その際、塩基数20程度、GC含量が約50%となる部分を探索した。その結果、フォワード及びリバースのプライマーとして各3種類ずつが設計された (表1)。これらのプライマーの大腸菌のナンバリングにおける位置は、AERO-Fが439~486、AERO-F1が436~466、AERO-F2が694~713、AERO-Rが1055~1031、AERO-R1が1060~1039、AERO-F2が1001~982であった。こうして設計した塩基配列に従い、DNA合成機を用いてプライマーを合成し、特異性を確認したところ表1記載のプライマー (AERO-F1とAERO-R1) において好適な結果が得られた。

【0030】

【表1】

プライマー	direction	配列 (5'→3')	base	position
ABRO-F	forward	5'-TCAGCAGGGAAGAGTCAAGACTGT-3'	24	439-486
AERO-F1	forward	5'-CTTTCAGCAGGGAAGAGTCAA-3'	21	436-466
AERO-F2	forward	5'-GAATGCGCAGATATCGGGTG-3'	20	694-713
ABRO-R	reverse	5'-TGCACCACTGTATGGGCTCCTCT-3'	24	1055-1031
ABRO-R1	reverse	5'-AGCCATGCACCACTGTATGG-3'	21	1060-1039
AERO-R2	reverse	5'-CCATATGTCAAGCCCTGGTA-3'	20	1001-982

【0031】実施例2 プライマーとユーバクテリウム属細菌との反応性の検討：本発明のプライマーが、実際にアエロファシエンス特異性を有しているかを確認するため、ユーバクテリウム属細菌の各菌種の基準株、参考株及び分離株とプライマーとの反応性を検討した。

(1) 菌株の純粋培養及びコロニーの単離

表2に示す、9菌種14株のユーバクテリウム属細菌及び他の属に属する腸内細菌5株をEG培地（栄研社製）にて嫌氣的に二晩純粋培養した。こうして得た菌体15種類各々のコロニーをかきとり、0.5mlのエッペンドルフチューブを用いて、滅菌水に懸濁した。これを100℃で5分間ボイルし、熱変性させた後に本発明のプライマーを用いてPCR反応を行なった。

【0032】(2) PCR反応

総量を100μlとし、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂及び200μM dNTP混合物に、各々0.25pMプラ*

*イマー (AERO-F1及びAERO-R1)、2.5U Taq DNAポリメラーゼ（タカラ社製）、鋳型DNAを含む反応液で、DNAサーマルサイクラー（Perkin-Elmer, Norwalk, conn.）により、94℃3分の後、94℃30秒、63℃1分30秒、72℃2分を25サイクルのPCR反応を行なった。

【0033】(3) プライマーの菌種特異性の検討

(2)で得られたPCR産物を電気泳動し、バンドの有無によりプライマーと各菌株のDNAとの結合能を確認し、プライマーの特異性を判定した。1%Agarose Type II（シグマ社製）で、ミュービットにより100V、25分電気泳動し、ethidium Bromideで染色後、UVランプ下でバンドを観察した。その結果、プライマーはアエロファシエンス特異的にバンドを形成した（表2）。

【0034】

【表2】

菌 種	株 名	P C Rでの結果
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	JCM 6479 ^T	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	JCM 7790	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	JCM 7791	+
<i>Eubacterium lentum</i>	JCM 9979 ^T	-
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	A107	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	A235	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	A243	+
<i>Eubacterium barkeri</i>	JCM 1389 ^T	-
<i>Eubacterium limosum</i>	JCM 6421 ^T	-
<i>Pseudoramibacter alactolyticum</i>	JCM 6480 ^T	-
<i>Eubacterium multiforme</i>	JCM 6484 ^T	-
<i>Eubacterium nitritogenes</i>	JCM 6485 ^T	-
<i>Eubacterium tenue</i>	JCM 6486 ^T	-
<i>Eubacterium desmolans</i>	JCM 6566 ^T	-
<i>Eubacterium cylindroides</i>	JCM 7786 ^T	-
<i>Mitsuokella multiacida</i>	JCM 2054 ^T	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	JCM 1217 ^T	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	JCM 5826 ^T	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	JCM 6325 ^T	-

【0035】TはType（基準株）を示す。PCRの結果はAERO-F1とAERP-R1を用いた場合の結果である。A107とA235とA243は分離株である。

【0036】実施例3 プライマーを用いた分離株からのアエロファシエンス同定：ヒトの糞便由来の分離株から、性状試験によりグラム陽性桿菌約300株を選別した。これらについて、従来の性状試験及び本発明のプライマーによる同定を行ない、プライマーの特異性を確認した。

（1）菌株の純粋培養及びコロニーの単離
性状試験からユーバクテリウム属と同定された新鮮分離株約300株をEG培地で2日間嫌気培養したコロニーを滅菌水に懸濁し、熱変性したものをサンプルとした。

（2）PCR反応

（1）で得られたDNAを鋳型とし、実施例2と同一の条件でPCR反応を行なった。

（3）プライマーの菌種特異性の検討

分離株をEG培地で嫌気培養することにより得られた約300株について、糖分解試験を行なったところ、178株がユーバクテリウム・アエロファシエンスと同定された。一方で、300株に本発明のプライマーを用いてPCR反応を行なったところ、糖分解試験と同一の17*

* 8株のDNAのみに増幅が見られた。なお、この178株のうちから、A107株、A235株、A243株の3株（表2に記載）についてシーケンシングを行なったところ、ユーバクテリウム・アエロファシエンスJCM6479株、JCM7790株及びJCM7791株と同様に、設計したプライマー配列を有していることが確認された。さらにA107株についてJCM6479株、JCM7790株及びJCM7791株とDNA-DNAホモロジーを行ない、同種であることを確認した。

【0037】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

起源

生物名：ユーバクテリウム・アエロファシエンス (*Eubacterium aerofaciens*)

株名：JCM 6479

配列

CTTTCAGCAG GGAAGAGTCA A

(7)

特開平 1 1 - 1 2 7 8 9 8

11

12

【 0 0 3 8 】 配列番号 : 2

* 配列の種類 : DNA

配列の長さ : 2 1

起源

配列の型 : 核酸

生物名 : ユーバクテリウム・アエロファシエンス (Eubacterium aerofaciens)

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

* 株名 : J C M 6 4 7 9

配列

AGCCATGCAC CACCTGTATG G

21

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

C 1 2 R 1:01)